



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	Klotho mice: a novel wound model of aged skin (Klotho マウス : 老化皮膚研究のための新しい創傷治癒モデル実験動物)
Author(s) 著 者	山下, 建
Degree number 学位記番号	乙第 2850 号
Degree name 学位の種別	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2015-06-02
Original Article 原著論文	
Doc URL	
DOI	
Resource Version	

学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	乙第 2850 号	氏 名	山下 建
<p>Klotho mice: A novel wound model of aged skin Klotho マウス：老化皮膚研究のための新しい創傷治癒モデル実験動物</p> <p>研究目的 老化皮膚に潰瘍を形成した場合、治癒まで長期を要することは少なくない。しかし、その治癒遷延のメカニズムはいまだ十分に解明されていない。基礎研究に用いる適切な老化動物モデルが少ないことも原因の一つと考えられる。これまで、老化の表現型の一部分を表すマウスは開発されてきたが、皮膚における多彩な老化症状（萎縮、乾燥、荒れ、色素沈着、しわ、たるみなど）と類似の表現型を示すモデルはわずかであった。その中で、われわれは、Klotho 蛋白質の欠損マウスである Klotho マウスに着目した。このマウスは常染色体劣性遺伝にてホモ変異型に限って蛋白質欠損が発現し、短命、不妊、肺気腫、動脈硬化、骨粗鬆症、皮膚萎縮などのヒト老化の表現型に酷似した異常が認められる。この多彩な症状を呈する Klotho マウスを用い、老化皮膚潰瘍モデルの作成を目的として研究を行った。</p> <p>研究準備 Klotho マウスを扱う際の問題は、老化が急速に進むがゆえの、その脆弱性であった。Klotho マウスは開発当初より全身麻酔、手術などの外的ストレスに極端に弱いとされており、皮膚に物理的な傷害を与えると操作直後に大半が死亡するため、実験を行うことは困難と報告されていた。われわれも当初は 50%近い死亡率を認め、データ集積は困難な状況であった。しかし、生存率改善のため、ケージ内での床敷や室温、飲水・食飼、麻酔薬量などにおけるストレスを極力与えず、さらに実験中の愛護的操作を徹底、手術侵襲を可及的に軽減することで死亡率を 10%以下に減らし、老化皮膚潰瘍モデルとしての安全な利用を可能にした。 具体的には</p> <ul style="list-style-type: none">・ ヒートパックを用いた周術期の低体温の予防・ 手術の準備を事前に整え、実験手技を手早く行う・ 体格の小さい Klotho マウスに適した量の麻酔薬を用いる・ 6 週齢以上の Klotho マウスでは実験を避ける・ 餌のペレットを水に浸して食べやすくする・ 実験の 1 日前に一匹ずつにケージを分ける・ ケージ内に巣の材料を十分に準備する <p>等の手厚い看護が、実験に際して必要であった。</p> <p>研究方法 野生型マウス（C57BL/6）と Klotho ヘテロ欠損マウス、Klotho ホモ欠損マウス（Klotho マウス）の背部にそれぞれ直径 8mm の皮膚欠損創を作成し、以下の比較検討を行った。</p> <ol style="list-style-type: none">1. 創閉鎖期間2. 創作成前、および創作成後 4 日目と 7 日目の病理組織像（H-E 染色、Masson trichrome 染色）			

3. RT-PCR 法による I 型・III 型コラーゲンの mRNA の発現

研究成績

1. 野生型、および Klotho ヘテロ欠損マウスと比較し、Klotho ホモ欠損マウスでは創傷治癒の遅延を認めた。野生型、ヘテロ欠損マウスともに創閉鎖に平均 19 日間要したのに対し、Klotho ホモ欠損マウスでは平均 35 日間必要であった。

2. 病理組織上、Klotho ホモ欠損マウスでは野生型と比較し、毛根数の減少、真皮層・脂肪層の菲薄化、真皮コラーゲン量の減少がみられた。創作成後 4 日目と 7 日目では野生型と比較し、肉芽組織、炎症細胞数、コラーゲン量の減少が認められた。

3. 野生型、および Klotho ヘテロ欠損マウスと比較し、Klotho ホモ欠損マウスでは創作成後 4 日目と 7 日目の双方で、I 型、III 型コラーゲンともに mRNA の発現が抑制されていた。

考察

これまで開発された老化モデルマウスのなかで、皮膚老化の多彩な症状が現れるモデルはほとんどなかった。本研究の結果、Klotho マウス（Klotho ホモ欠損マウス）は野生型マウスと比べ、病理組織学的にヒト老化皮膚に類似した像を呈し、老化皮膚のモデル動物として利用が可能であった。

さらに、創作成実験において、Klotho マウスでは創傷が治癒するのに 2 倍の時間がかかり、大幅な遷延がみられた。ヒトにおいても高齢者の創閉鎖は若年者の 2 倍近く時間がかかるとの報告があり、ほぼ同比率の治癒遷延が得られた。また、病理組織学的にも上皮化、コラーゲン合成、血管新生において遅延がみられた。コラーゲン遺伝子の発現も抑制されており、これらのデータは老化における創傷治癒遷延に関する報告と同様であった。これらの結果により、Klotho マウスは老化皮膚の創傷治癒研究において良いモデルになりうる可能性が示唆された。

結果

Klotho ホモ欠損マウスではヒト老化皮膚に類似した症状、病理組織像を呈し、また、創作成時においても高齢者に酷似した創治癒の遷延、および病理組織像、コラーゲン遺伝子発現の抑制を示し、老化皮膚潰瘍モデルとしてふさわしいものであることが示唆された。

ただし、Klotho マウスは脆弱であるため、実験時の手厚い看護が必要であり、これを守ること、ヒト老化と類似した症状を呈する Klotho マウスを、老化皮膚潰瘍モデルとして利用することが可能となった。

論文審査の要旨及び担当者

(平成 27 年 6 月 2 日授与)

報告番号	乙第 2850 号	氏 名	山下 建
論文審査 担 当 者	主査 教授 四ツ柳 高敏	副査 教授 山下 利春	
	委員 教授 櫻井 晃洋	委員 教授 鈴木 拓	

論文題名	Klotho mice: a novel wound model of aged skin (Klotho マウス:老化皮膚研究のための新しい創傷治癒モデル実験動物)
結果の要旨	
<p>本研究では、短命で脆弱である Klotho マウスを用い、老化皮膚潰瘍モデルとしての利用の可能性を示した。Klotho マウスではヒト老化皮膚の特徴である皮膚萎縮、脱毛がみられ、病理組織像ではコラーゲン量が減少していた。創作成後では高齢者に類似した明らかな創治癒の遷延がみられ、病理組織像でも炎症反応が減弱していた。これらより、Klotho マウスは老化皮膚潰瘍モデルとしてふさわしいものであることが示唆された。本研究は Klotho マウスで皮膚潰瘍モデルの作成が可能であることを示した初めての報告であり、今後の老化皮膚研究に有用と考えられる。以上、この研究は、学位（医学博士）授与に値する、との審査委員全員の評価を得た。</p>	